

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE BIOCÊNCIAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

LUÍS FERNANDO SARAIVA MACEDO TIMMERS

Estudos *in silico* da enzima EPSP sintase de *Mycobacterium tuberculosis*

Porto Alegre

2015

LUÍS FERNANDO SARAIVA MACEDO TIMMERS

Estudos *in silico* da enzima EPSP sintase de *Mycobacterium tuberculosis*

Tese apresentada como requisito para a obtenção do título de Doutor pelo Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da Faculdade de Biociências da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

Orientador: Osmar Norberto de Souza

Porto Alegre

2015

Dedico esta tese a minha mãe,
Magda Saraiva Macedo, por todo
amor, carinho e incentivo.

“Nobody ever figures out what life is all about, and it doesn't matter. Explore the world. Nearly everything is really interesting if you go into it deeply enough”

Richard Feynman

Agradecimentos

Inicialmente gostaria de agradecer ao Prof. Dr. Osmar Norberto de Souza pela oportunidade e orientação ao longo desses anos. Pela confiança e liberdade para trabalhar em assuntos tão diversos. Pela amizade, apoio e conversas sobre os mais diversos assuntos.

Aos Professores Dr. Diógenes Santiago Santos e Luiz Augusto Basso pela confiança concedida para realizar parte desta tese no laboratório CPBMF.

Aos Professores Michele Vendruscolo e Alfonso de Simone pela orientação durante o período de doutorado sanduíche no Departamento de Química – Universidade de Cambridge – Reino Unido.

Ao Professor Dr. Rinaldo Wander Montalvão e ao doutorando Antônio Marinho pela amizade e apoio e conhecimentos compartilhados durante este período.

À minha mãe, pelo amor incondicional e por todo apoio nas horas difíceis. Fez tudo para que eu sempre seguisse em frente sem nunca pensar em desistir. Não tenho palavras para descrever o quanto sou grato. Sem o teu apoio eu com certeza não chegaria até aqui!

À minha namorada Ivani Pauli pelo amor e compreensão em todas as horas. Por todos os momentos que passamos juntos desde a graduação em Biologia. Pelas palavras de apoio e discussões sobre contatos e metodologias que foram imperativas para o desenvolvimento desta tese. Não tenho palavras para descrever a sua importância.

Ao meu amigo Guy Barros Barcellos pela amizade e apoio ao longo desses anos.

Ao meu amigo e incentivador Rafael Andrade Caceres por todo o conhecimento compartilhado desde a minha iniciação científica. E se hoje eu continuo nessa área é porque ele me mostrou o quão bela esta carreira poderia ser.

Aos meus amigos José Fernando Ruggiero Bacheга e Thiago Lipinski-Paes pela amizade e apoio durante esses anos.

A todos os colegas do LABIO, Walter, Vanessa, Michele, Gustavo, Mirocem, Anderson e Denise pela amizade.

Aos colegas do CPBMF Diana, Zilpa, Leonardo Rosado, Rodrigo Ducatti, Daiana Renck, Mariane Rotta que tiveram a coragem de dividir o espaço da bancada comigo.

A todas às pessoas que de alguma forma, direta ou indiretamente, contribuíram para que este trabalho tivesse êxito.

Resumo

Estudos *in silico* e *in vitro* da enzima EPSP sintase de *Mycobacterium tuberculosis*

O reconhecimento biomolecular está diretamente ligado à capacidade de uma proteína a suportar mudanças conformacionais, ou seja sua plasticidade. Compreender como ocorre a associação de ligantes com seus receptores, como proteínas se interrelacionam, porque ocorrem os processos de agregação, são de extrema importância, não apenas para a área da biofísica, como também para o desenho racional de fármacos. Técnicas como cristalografia por difração de raios X, ressonância magnética nuclear e dinâmica molecular, são algumas das principais abordagens para o estudo da flexibilidade em macromoléculas biológicas. No entanto, esta não é uma tarefa simples.

Esta tese de doutorado versará sobre o papel da flexibilidade em dois sistemas distintos, (i) a enzima EPSP sintase de *Mycobacterium tuberculosis* e (ii) a proteína Calmodulina de *Mus musculus*.

A Parte 1 trará como modelo de estudo a enzima EPSP sintase de *Mycobacterium tuberculosis*. O nosso objetivo com esta parte foi analisar em detalhes as informações estruturais desta enzima, por meio da técnica de dinâmica molecular. Como resultados, propomos como a flexibilidade pode atuar na modulação da atividade enzimática, a hipótese dos cinco mínimos locais de energia, bem como, suas implicações para o processo de docagem molecular a partir de uma estrutura.

A Parte 2 foi desenvolvida durante o período de doutorado sanduíche e teve como alvo a proteína Calmodulina de *Mus musculus*. O objetivo na Parte 2 desta tese foi estudar a influência de mutações no processo de reconhecimento molecular com a Calmodulina, por meio das técnicas de ressonância magnética nuclear e calorimetria por titulação isotérmica. Como resultados, observamos a influência da região de dobradiça para o reconhecimento dos peptídeos avaliados, bem como, um processo de balanço entrópico-entálpico na associação destas moléculas.

Abstract

In silico and in vitro studies of Mycobacterium tuberculosis EPSP sintase

Biomolecular recognition processes are intrinsically related to protein flexibility. To understand how ligands interact with its partners, how proteins can cooperate with each other, or why aggregation process occurs, are particularly important, not only to biophysics, but also in the rational drug design process. X-ray crystallography, nuclear magnetic resonance, and molecular dynamics simulations are broadcasted approaches used to try to comprehend flexibility in biological macromolecules, although, this is not an easy task.

This Ph.D. thesis will discuss the role of the flexibility using two different systems, (i) *Mycobacterium tuberculosis* EPSP synthase and (ii) Calmodulin from *Mus musculus*.

Our main goal with this first system was to analyse in detail the structural information of the EPSP synthase, using molecular dynamics simulation. As a result, we have hypothesised how EPSP synthase flexibility could affect its activity, as well as its implications in the process of molecular docking experiments.

Calmodulin project was developed during a ten month internship at the University of Cambridge. Our main goal was to study the influence of peptide mutated sequences in the process of molecular recognition, using nuclear magnetic resonance and isothermal titration calorimetry. As a product of this work, we have observed the impact of the linker domain to the peptide recognition, as well as, we have presented the importance of the entropy-enthalpy balance in the association with Calmodulin

Sumário

Prefácio.....	10
Introdução	12
1.1 A enzima EPSP sintase	12
1.1.1 A estrutura da EPSP sintase de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	13
1.1.2 O sitio ativo e o mecanismo catalítico da MtEPSP sintase.....	14
1.2 Motivação: A flexibilidade conformacional.....	16

PARTE 1

Prefácio

A enzima EPSP sintase, catalisadora da sexta etapa da via do ácido chiquímico, tornou-se um alvo atraente para o planejamento de fármacos a partir da década de 1970, quando a companhia Monsanto anunciou a descoberta do seu inibidor, o herbicida glifosato. Por conseguinte, a susceptibilidade desta enzima à ação de fármacos encorajou o estudo da EPSP sintase de outros organismos como alvo para o desenvolvimento de fármacos e herbicidas. Desde então, os esforços têm se concentrado na caracterização molecular, estrutural e enzimática da EPSP sintase de diversos organismos como *Escherichia coli*, *Coxiella burnetii*, *Agrobacterium sp.*, *Streptococcus pneumoniae*, *Bacillus halodurans*, *Vibrio cholerae*, *Mycobacterium tuberculosis*, dentre outros.

A EPSP sintase está presente em plantas, algas, fungos, bactérias e parasitas do filo apicomplexa; até o presente momento ela não foi encontrada em mamíferos. Esta enzima apresenta em média 450 resíduos de aminoácidos, estruturalmente distribuídos em dois domínios globulares interligados por um pentapeptídeo. Esta topologia confere à EPSP sintase a possibilidade de assumir conformações bem distintas, representadas por estados abertos e fechados, quando os dois domínios estão mais próximos ou mais afastados respectivamente. Este fenômeno é muito importante porque é na interface entre esses domínios que se encontra o sitio ativo da enzima. Portanto, espera-se que a flexibilidade da EPSP sintase tenha um papel fundamental no seu modo de ação. Assim sendo, a compreensão da flexibilidade intrínseca da EPSP sintase pode ser de grande relevância para a prospecção *in silico*, *in vitro* e *in vivo* de novos inibidores.

Apesar de existir seis estruturas tridimensionais da EPSP sintase de *Mycobacterium tuberculosis* no banco de dados de proteínas (PDB), artigos descrevendo-as ainda não foram publicados. Portanto, as características importantes para o funcionamento desta enzima, como resíduos essenciais para a catálise, ainda não foram determinadas. Por estes motivos, a EPSP sintase de *Mycobacterium tuberculosis* será a enzima de estudo da primeira parte desta tese de doutorado.

Capítulo 1

1. Introdução
 - 1.1 A enzima EPSP sintase
 - 1.1.1 *A estrutura da EPSP sintase de Mycobacterium tuberculosis*
 - 1.1.2 *O sitio ativo da MtEPSP sintase*
 - 1.2 A via do ácido chiquímico
 - 1.3 Motivação: A flexibilidade conformacional
-

"There should be no boundary to human endeavour. However bad life may seem, while there is life, there is hope."

Stephen Hawking

Introdução

1.1 A enzima EPSP sintase

Em 1990, Thomas Garbe e colaboradores caracterizaram a enzima 5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato (EPSP) sintase (EC 2.5.1.19) de *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) (Garbe et al., 1990). A EPSP sintase é a enzima responsável por catalisar o sexto passo da via do ácido chiquímico, a reação de transferência da porção enolpiruvil do fosfoenolpiruvato (PEP) para o chiquimato-3-fosfato (S3P), gerando o EPSP e um fosfato inorgânico (**Figura 1**) como produtos (Lewis et al., 1999).

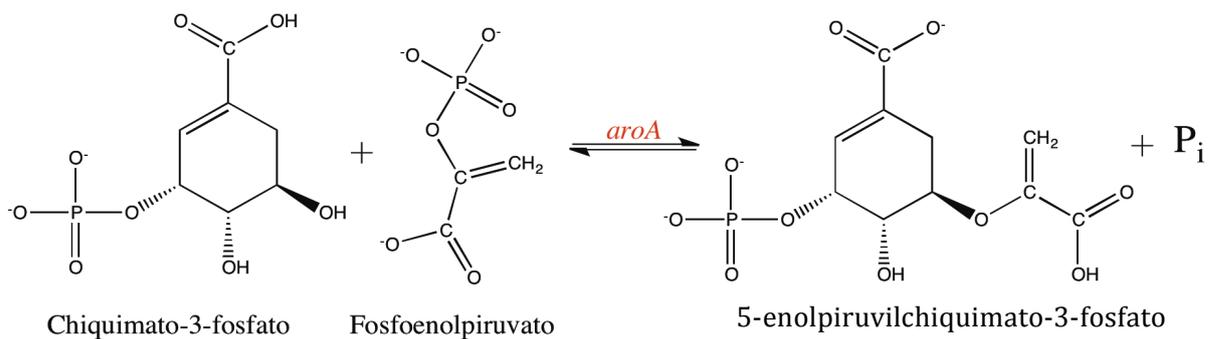


Figura 1. Reação de transferência da porção enolpiruvil do fosfoenolpiruvato (PEP) para o chiquimato-3-fosfato (S3P) gerando o EPSP e um fosfato inorgânico, catalisada pela enzima MtEPSP sintase. Imagem gerada com ChemDraw (Mills, 2006).

A *N*-fosfometilglicina (glifosato) foi sintetizada primeiramente em 1950 pelo químico suíço, Dr. Henry Martin, de uma pequena companhia farmacêutica chamada Cilag. Porém, por não ter apresentado aplicação farmacêutica, não foi relatada na literatura. Em 1959, a companhia Cilag foi comprada pela Johnson & Johnson que vendeu suas pesquisas, incluindo o glifosato, para a Aldrich. Apenas um ano mais tarde, em 1960, a Aldrich vendeu pequenas quantidades do composto para diversas empresas farmacêuticas sem ter um motivo claro (Franz et al., 1997; Dill et al., 2008). Em 1970, um grupo de pesquisadores da empresa Monsanto, liderado pelo químico orgânico Dr. John Edward Franz, testou e patenteou o glifosato (*Round-up*) como herbicida (Franz et al., 1997; Alibhai e Stallings, 2001; Duke e Powles, 2008). Em 1972 o Dr. Ernest G. Jaworski descobriu que o glifosato inibia a via de biossíntese de aminoácidos (AA) aromáticos (Jaworski, 1972) e, em 1980, o Dr. Nikolaus

Amrhein e colaboradores identificaram que a enzima EPSP sintase era o alvo primário deste herbicida (Amrhein et al., 1980).

1.1.1 A estrutura da EPSP sintase de *Mycobacterium tuberculosis*

A EPSP sintase, codificada pelo gene *aroA*, é composta por 450 aminoácidos (AA) e tem massa molecular de aproximadamente 46 kDa (Oliveira et al., 2003). Esta enzima apresenta-se como um monômero em solução, sendo esta a sua unidade biológica funcional. A estrutura terciária da EPSP sintase de Mtb (MtEPSP), primeiramente descrita por meio de modelagem comparativa por homologia (Pereira et al., 2003), apresenta dois domínios globulares aproximadamente esféricos, com um raio de 21 Å cada, compostos de 14 hélices- α envoltas por 20 fitas- β , distribuídas em 6 folhas- β , 3 para cada domínio (**Figura 2**). Cada domínio contém três cópias do enovelamento $\beta\alpha\beta\alpha\beta$, podendo-se observar que as fitas se organizam em folhas- β paralela e antiparalela, enquanto as hélices- α estão todas dispostas paralelas entre si.

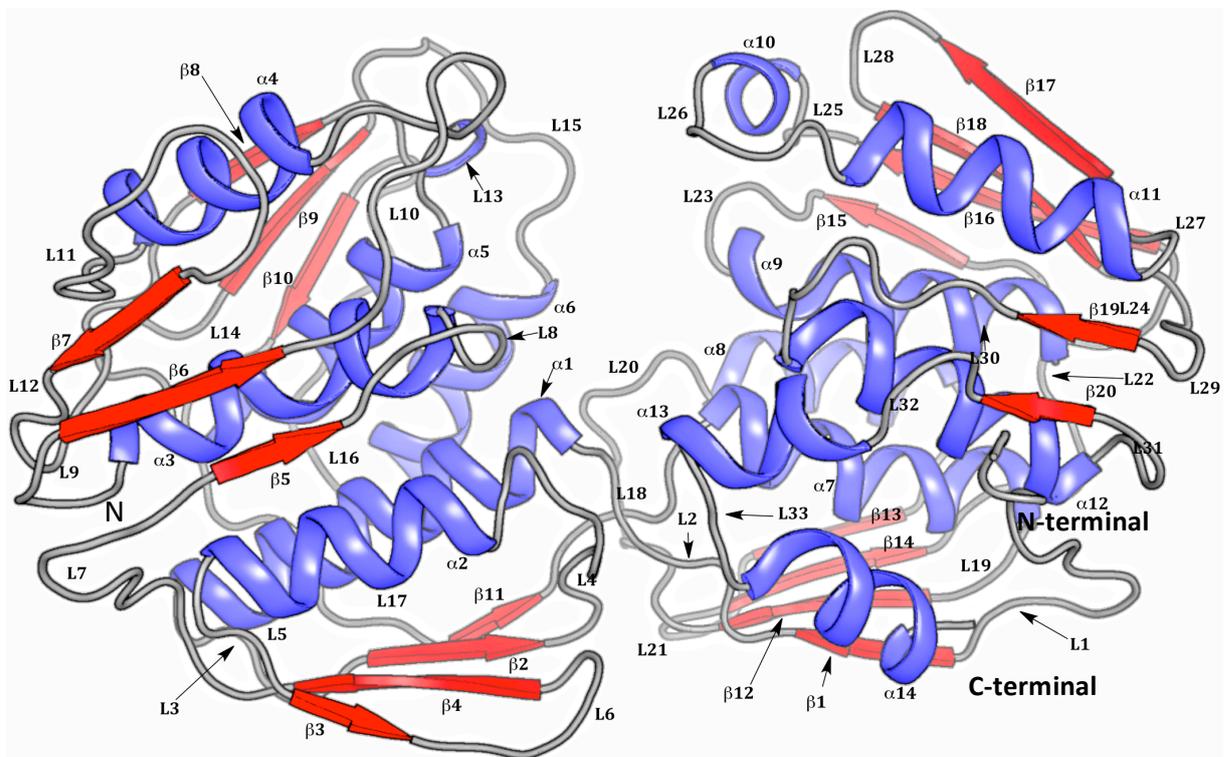


Figura 2. Estrutura monomérica da enzima MtEPSP sintase (código de acesso ao PDB: 2BJB). Representação do tipo *Cartoon* da cadeia principal da subunidade A. As hélices- α estão coloridas em azul escuro, as fitas da folha β estão coloridas em vermelho escuro e as alças estão coloridas em cinza escuro. As estruturas secundárias estão destacadas com os códigos "L" para volta e alças, " α " para as hélices- α e " β " para as fitas- β . As porções N e C-terminal estão identificadas na figura na porção anterior da estrutura. Imagem gerada com PyMOL (Schrodinger, LLC, 2010).

Estudos pelas técnicas de modelagem comparativa por homologia e espectrometria de massas revelaram que a estrutura da EPSP sintase pode ser observada em duas conformações distintas, aberta e fechada (Schönbrunn et al., 2001; Pereira et al., 2003; Borges et al., 2006; Neto et al., 2008). A forma aberta encontra-se descrita apenas para a enzima livre (código de acesso ao PDB: 2BJB). A forma fechada ocorre quando a enzima está associada a ligantes (código de acesso ao PDB: 2O0X, 2O0Z, 2O0E).

1.1.2 O sítio ativo e o mecanismo catalítico da MtePSP sintase

O sítio ativo da MtePSP sintase está localizado na interface entre os dois domínios da enzima (**Figura 2**). Sua cavidade, na forma livre, possui um volume de 5.586 \AA^3 e uma área acessível ao solvente de 2.188 \AA^2 . S3P e PEP constituem os dois substratos desta enzima, com sítios de ligação distintos. S3P e PEP se associam por meio de interações não covalentes com os resíduos Ser24, Arg28, Ser167, Ser168, Ser196, His199, His336 e His340 (**Figura 3**) e Lys23, Gly96, Arg124, Gln169, His340, Glu341, Arg344, His384, Arg385 e Lys410 (**Figura 4**), respectivamente.

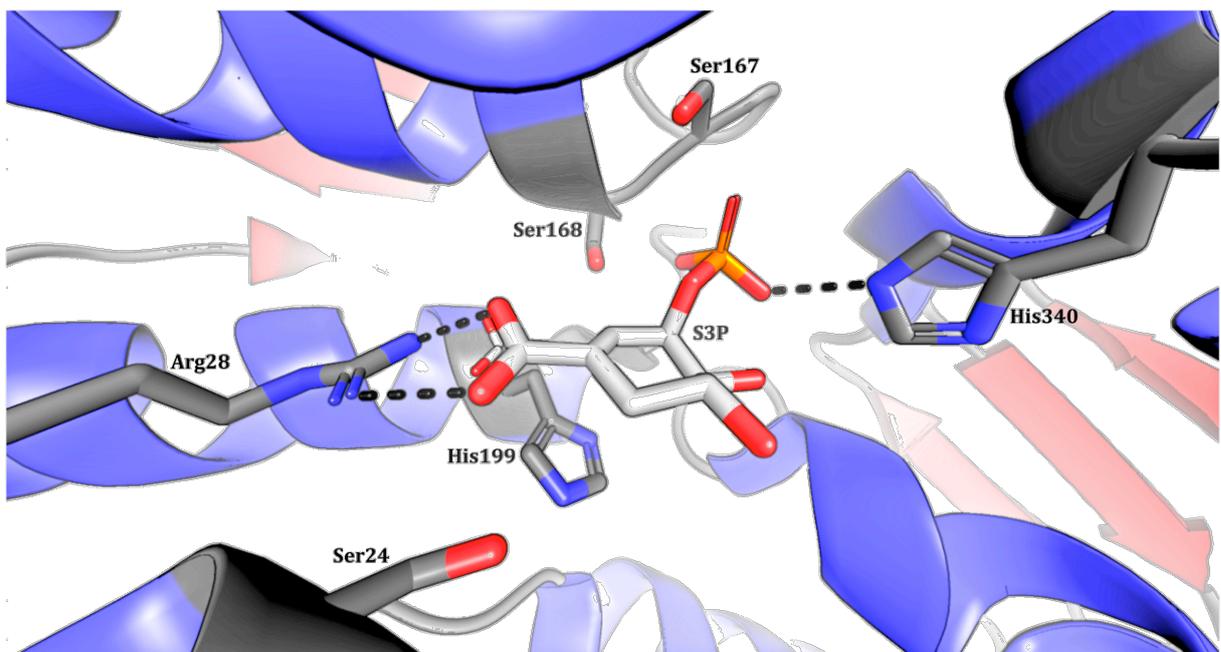


Figura 3. Sítio de ligação do S3P. Representação do tipo *Cartoon* da cadeia principal (código de acesso ao PDB: 2O0E). Os resíduos que participam de interações com o S3P estão representados com o modelo de palito e colorido pelo tipo dos átomos (carbono: cinza escuro; oxigênio: vermelho e nitrogênio: azul). O S3P está colorido por átomos (carbono: cinza claro; fosfato: laranja e oxigênio: vermelho) e representados pelo modelo de palitos. Imagem gerada com PyMOL (Schrödinger, LLC, 2010).

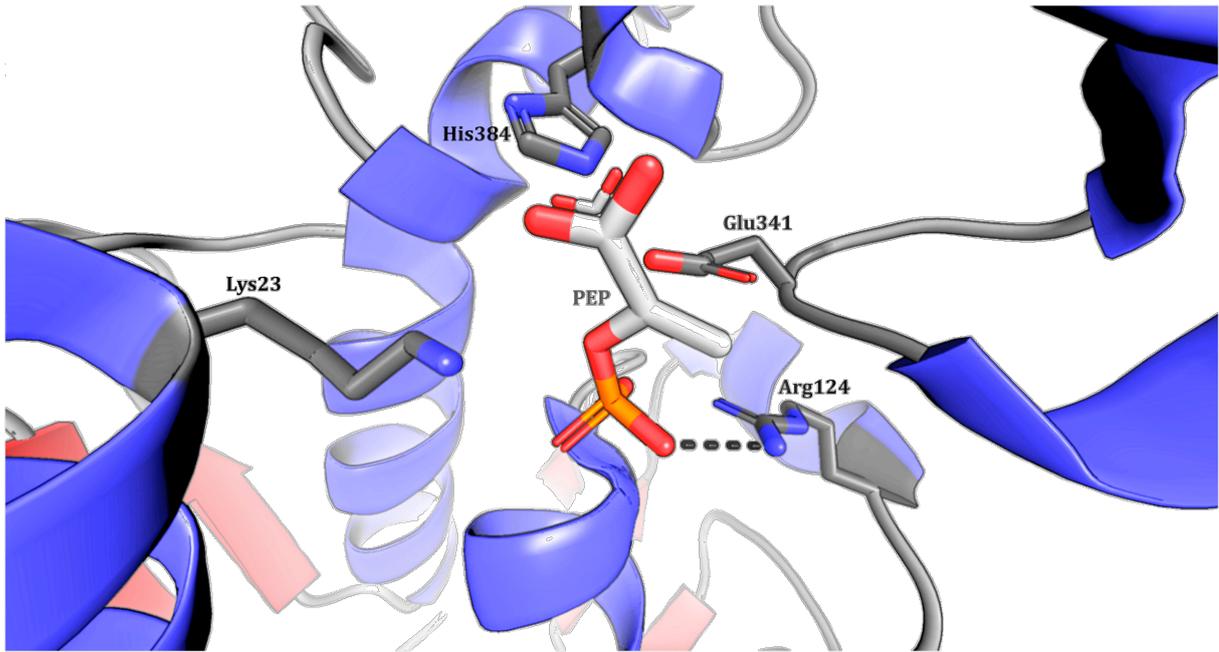


Figura 4. Sítio de ligação do PEP. Representação do tipo *Cartoon* da cadeia principal (código de acesso ao PDB: 2O0E). Os resíduos que participam de interações com o PEP estão representados com o modelo de palito e colorido pelo tipo dos átomos (carbono: cinza escuro; oxigênio: vermelho e nitrogênio: azul). O PEP está colorido por átomos (carbono: cinza claro; fosfato: laranja e oxigênio: vermelho) e representados pelo modelo de palitos. Imagem gerada com PyMOL (Schrödinger, LLC, 2010).

Levin e Sprinson (1964) propuseram o mecanismo de reação adição-eliminação para a enzima EPSP sintase de *Escherichia coli*. Segundo esta proposta, na primeira etapa da reação ocorre um ataque nucleofílico da hidroxila do S3P sobre o carbono beta do PEP (**Figura 1 e 5**, adição). Na segunda etapa, ocorre a eliminação do grupo fosfato pertencente à porção do PEP (**Figura 5**) (Levin e Sprinson, 1964).

Até o presente momento, não há consenso sobre quais são os resíduos de AA importantes para a reação catalisada pela EPSP sintase. Huynh e colaboradores (Huynh et al., 1988) identificaram que, em *Escherichia coli*, o motivo sequencial em torno resíduo Lys22 (Lys23 em MtEPSP sintase) tem um papel importante na associação dos substratos. Esta característica também foi observada na estrutura da EPSP sintase de *Petunia híbrida* (Lewendon e Coggins, 1983). Os autores evidenciaram a essencialidade de uma porção catiônica na posição 23 (Lys23), visto que a mutação Lys23Ala causa a perda da capacidade de catalisar a reação. Schönbrunn e colaboradores (Schönbrunn et al., 2001) sugeriram que os resíduos Glu341 e His385 podem estar relacionados com o mecanismo catalítico da enzima. Detalhes sobre este mecanismo pode ser encontrado em (Lewendon e Coggins, 1983; Schönbrunn et al., 2001; Berti e Chindemi, 2009).

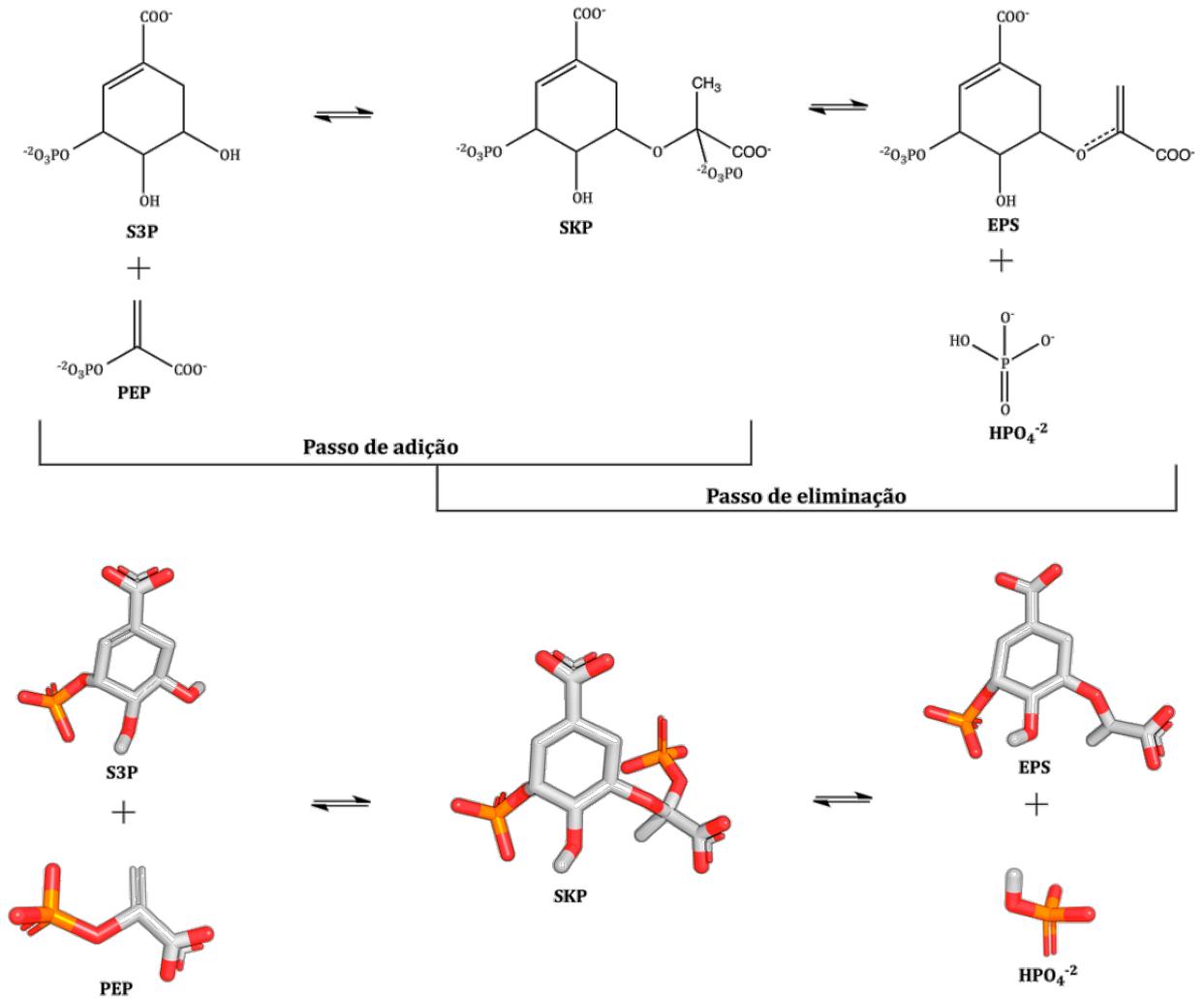


Figura 5. Mecanismo de reação de adição-eliminação proposto para a enzima EPSP sintase. As imagens 3D dos ligantes está colorida por átomos (carbono: cinza claro; fosfato: laranja e oxigênio: vermelho) e representada por palitos *Figura adaptada de* (Berti e Chindemi, 2009). Os programas ChemDraw (Mills, 2006) e PyMOL (Schrödinger, LLC, 2010) foram utilizados para a preparação da figura.

Apesar da existência de diversos estudos sobre o mecanismo catalítico da enzima EPSP sintase, a elucidação dos resíduos que estão participando ativamente deste processo permanece em aberto (Berti e Chindemi, 2009; Lou et al., 2012b).

1.2 Motivação: A flexibilidade conformacional

O reconhecimento biomolecular é a essência dos processos biológicos, e está diretamente associado a plasticidade (Cozzini et al., 2008; Leone et al., 2010; Feixas et al., 2014). Entender como ocorre a associação de ligantes com seus receptores, como proteínas se interrelacionam, porque ocorre os processos de agregação, são de extrema importância,

não apenas para a área da biofísica, como também para o planejamento racional de fármacos. O estudo deste processo tanto por técnicas experimentais quanto computacionais, não é uma tarefa simples. A dinâmica molecular é uma técnica amplamente utilizada para o estudo, em nível atômico, de mudanças conformacionais sofridas por proteínas, DNA, RNA, entre outros (Adcock e McCammon, 2006; Leone et al., 2010).

A enzima EPSP sintase de Mtb apresenta uma flexibilidade intrínseca, uma vez que seus processos de reconhecimento dos substratos, catálise da reação e liberação dos seus produtos são guiados pela aproximação e afastamento dos seus lobos. Apesar desta enzima ter sido amplamente estudada em organismos como *Escherichia coli* (Gruys et al., 1992; Schönbrunn et al., 2001; Mizyed et al., 2003; Berti e Chindemi, 2009; Lou et al., 2012b), pouco se sabe sobre sua homóloga em Mtb. E seus aspectos dinâmicos são, até o presente momento, considerados coadjuvantes para o processo de reconhecimento molecular.

O presente trabalho versará sobre a flexibilidade da enzima EPSP sintase de Mtb na forma associada a ligantes, bem como na sua forma livre. Ampliando os conhecimentos sobre a enzima e possibilitando, futuramente, a construção de um modelo farmacofórico dinâmico.